

59-219270

Dec. 10, 1984

L43: 5 of 5

METHOD AND REAGENT FOR **STABILIZATION** OF TETRAZOLIUM SALT WITH **CYCLODEXTRIN**

INVENTOR: YOSHIO YAMAMOTO, ET AL. (1)

ATTORNEY: JERRY J. JURYAKO, JR., D.C. (1)

FILED: 12/10/84

DATE: 12/10/84

DATE: 12/10/84

DATE: 12/10/84

DATE: 12/10/84

DATE: 12/10/84

DATE: 12/10/84

ABSTRACT:

PURPOSE: To prevent the loss of stability of a tetrazolium salt caused by thiol compound, etc., and to enable the use of the salt widely as a reagent.

20 DEC 24 13:17:50 U.S. Patent & Trademark Office 20142

59-219270

Dec. 10, 1984

L43: 5 of 5

METHOD AND REAGENT FOR **STABILIZATION** OF TETRAZOLIUM SALT WITH **CYCLODEXTRIN**

for the accurate colorimetry of a reducible substance, by using .beta.- and/or .gamma. **cyclodextrin** as active component.

CONSTITUTION: The tetrazolium salt having the partial structure of formula I, e.g. the compound of formula II (R^{sup.1}, R^{sup.2} and R^{sup.3} are organic residue) [open bracket, preferably the compound of formula III (X^{sup.1} and X^{sup.2} are -NO₂^{sub.2} or H; X^{sup.3} is -OCH₃^{sub.3}, -I or H), etc.] [close bracket] is **stabilized** by using a component containing .beta.-**cyclodextrin** and/or .gamma.-**cyclodextrin** as active component. The preferable concentration of the above **stabilizing** component is usually 0.1 approx. 0.3W/V% for .beta.-**cyclodextrin** and 0.1 approx. 3W/V% for .gamma.-**cyclodextrin**. Although the formazan compound produced by the reduction of the tetrazolium salt has high **dyeability** to glass, etc., however, the **dyeing** can be effectively prevented by the use of gelatin.

20 DEC 24 13:17:52 U.S. Patent & Trademark Office 20142

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—219270

⑪ Int. Cl.³
C 07 D 257/04
417/04
C 12 Q 1/26
G 01 N 31/22
33/50

識別記号

庁内整理番号
7132—4C
7431—4C
8213—4B
7621—2G
E 8305—2G

⑬ 公開 昭和59年(1984)12月10日

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 16 頁)

⑭ シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩
の安定化方法及び安定化用試薬

東京都板橋区赤塚3丁目17番10号

⑮ 発明者 花田寿郎

川越市大字南大塚784

⑯ 特 願 昭58—95185

⑰ 出 願 昭58(1983)5月30日

⑱ 出 願 人 和光純薬工業株式会社

⑲ 発 明 者 山西一彦

大阪市東区道修町3丁目10番地

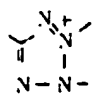
明 細 書

1. 発明の名称

シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の
安定化方法及び安定化用試薬

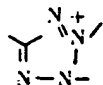
2. 特許請求の範囲

- (1) α -シクロデキストリン又は γ -シクロデ
キストリンを有効成分として用いる、部分構
造

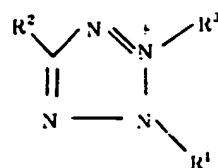


を有するテトラゾリウム塩の安定化
方法。

(2) 部分構造



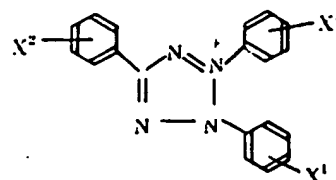
を有するテトラゾリウム塩が、一般式(I)で示
されるモノテトラゾリウム塩である、特許請
求の範囲第1項記載の安定化方法。



(I)

(但し、R¹、R²及びR³は有機残基を表わす。)

- (3) 一般式〔I〕で示されるモノテトラゾリウ
ム塩が、一般式〔II〕で示されるモノテトラ
ゾリウム塩である特許請求の範囲第2項記載
の安定化方法。

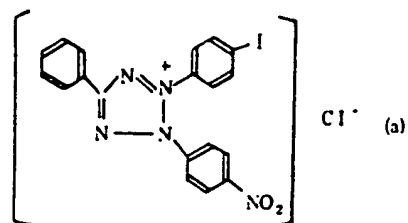


(II)

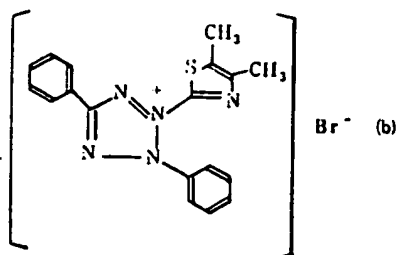
(但し、X¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わ
し、X³は、-OCH₃、-I又は-Hを表わす)

- (4) 一般式〔II〕で示されるモノテトラゾリウ
ム塩が構造式(4)で示されるモノテトラゾリウ

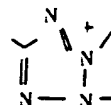
ム塩である特許請求の範囲第3項記載の安定化方法。



(5) 一般式〔Ⅰ〕で示されるモノテトラゾリウム塩が、構造式(b)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第2項記載の安定化方法。

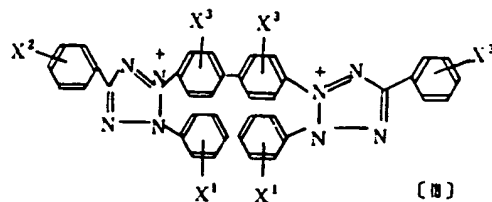


(6) 部分構造



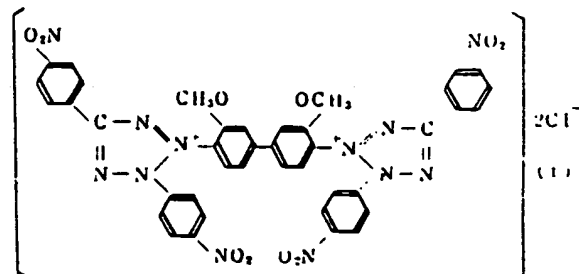
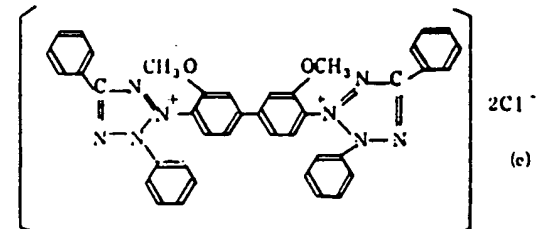
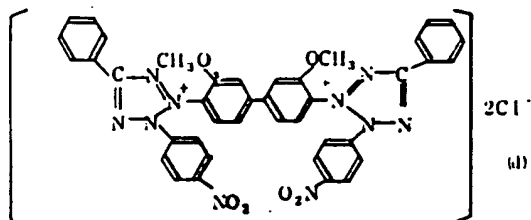
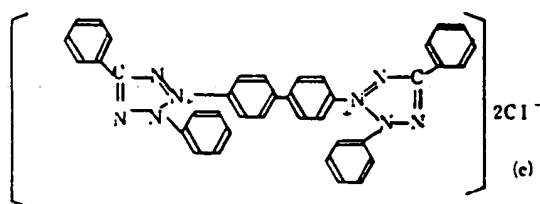
を有するテト

ラゾリウム塩が、一般式〔Ⅱ〕で示されるジテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第1項記載の安定化方法。



(但し、X¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わし、X³は-OCH₃、-I又は-Hを表わす。)

(7) 一般式〔Ⅲ〕で示されるジテトラゾリウム塩が、構造式(c)乃至(f)で示されるジテトラゾリウム塩の1である特許請求の範囲第6項記載の安定化方法。



(8) 溶液中にβ-シクロデキストリン又はγ-シクロデキストリンを存在させる、特許請求の範囲第1項、第2項、第3項、第4項、第5項、第6項、又は第7項記載の安定化方法。

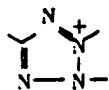
(9) 溶液中のβ-シクロデキストリンの濃度が0.01~1.5重量/容量%である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(10) 溶液中のγ-シクロデキストリンの濃度が0.01~1.0重量/容量%である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(11) 溶液中のβ-シクロデキストリン及びγ-シクロデキストリンの濃度が、β-シクロデキストリン0.01~1.5重量/容量%、γ-

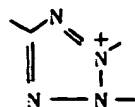
クロデキストリン 0.01~10 重量/容量% の範囲で任意の比率に混合した濃度である特許請求の範囲第 8 項記載の安定化方法。

(12) 溶液がチオール化合物及び部分構造



を有するテトラゾリウム塩及びβ-シクロデキストリン又はγ-シクロデキストリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液である、特許請求の範囲第 8 項、第 9 項、第 10 項又は第 11 項記載の安定化方法。

(13) チオール化合物及び部分構造

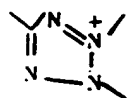


を有するテトラゾリウム塩及びβ-シクロデキストリン又はγ-シクロデキストリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液が、基質に作用してスーパーオキシド

は酸化酵素である、特許請求の範囲第 13 項又は第 14 項記載の安定化方法。

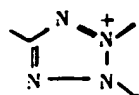
(17) 基質又は酸化酵素が体液成分である、特許請求の範囲第 16 項記載の安定化方法。

(18) β-シクロデキストリン又はγ-シクロデキストリンを有効成分として含有する部分構造

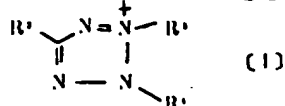


を有するテトラゾリウム塩の安定化用試薬。

(19) 部分構造



を有するテトラゾリウム塩が、一般式〔I〕で示されるモノテトラゾリウム塩である、特許請求の範囲第 18 項記載の安定化用試薬。



イオンを生成させる酸化酵素を含有する特許請求の範囲第 12 項記載の安定化方法。

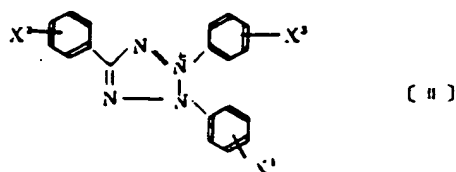
(14) グルコース、コレステロール、グリセロール、グリセロール燐酸エステル、コリン、アシル CoA、ピルビン酸、尿酸、キサンテン又は乳酸を基質とし、それらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール燐酸エステルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシル CoA オキシダーゼ、ピルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、キサンテンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼである、特許請求の範囲第 13 項記載の安定化方法。

(15) チオール化合物が、還元型グルタチオン、チオグリコール酸、メルカプトエタノール、チオサリチル酸、システアミン、システイン、ジメルカプトコヘク酸である特許請求の範囲第 12 項又は第 13 項記載の安定化方法。

(16) 基質又は酸化酵素が被検試料中の基質又は

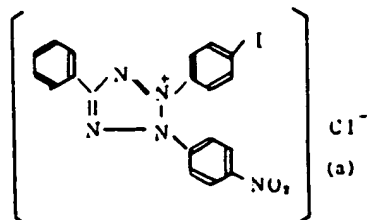
(但し、R¹、R²及びR³は有機残基を表わす。)

(20) 一般式〔I〕で示されるモノテトラゾリウム塩が、一般式〔II〕で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第 19 項記載の安定化用試薬

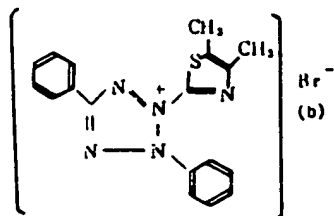


(但し、X¹及びX²は、-NO₂又は-H を表わし、X³は、-OCH₃、-I 又は-H を表わす。)

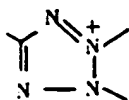
(21) 一般式〔I〕で示されるモノテトラゾリウム塩が構造式(a)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第 20 項記載の安定化用試薬。



(22) 一般式(Ⅰ)で示されるモノテトラゾリウム塩が、構造式(b)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第19項記載の安定化用試薬。

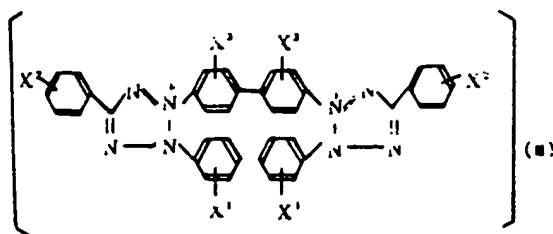


(23) 部分構造



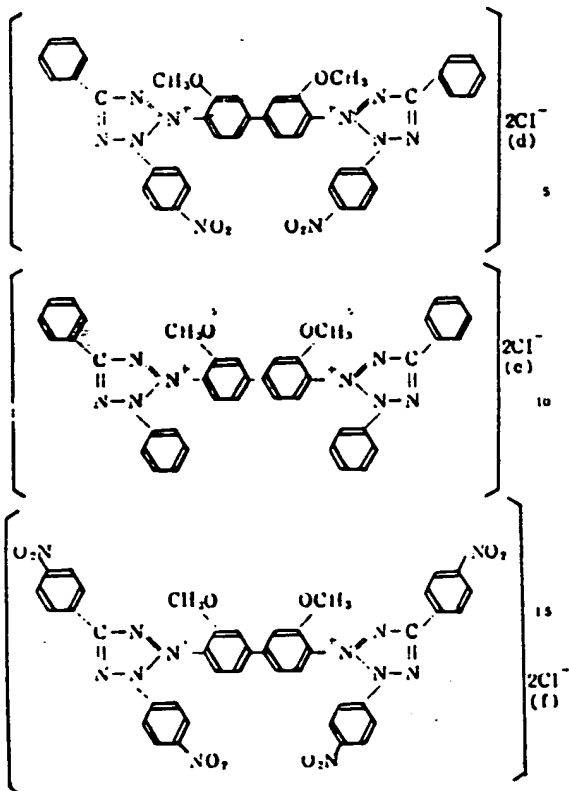
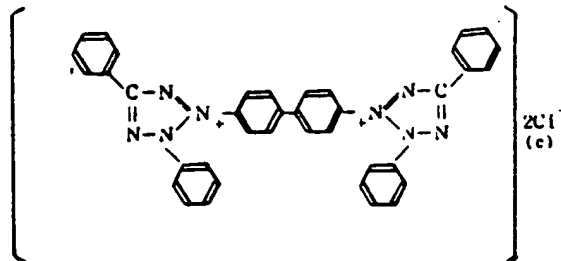
を有するテトラゾリウム塩が、一般式(Ⅱ)で示されるジテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第23項記載の安定化用試薬。

次の範囲第18項記載の安定化用試薬。



(但しX¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わし、X³は-OC(CH₃)₃、-I又は-Hを表わす。)

(24) 一般式(Ⅲ)で示されるジテトラゾリウム塩が、構造式(c)乃至(f)で示されるジテトラゾリウム塩の1である特許請求の範囲第23項記載の安定化用試薬。



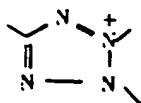
(25) 溶液中に β -シクロデキストリン又は γ -シクロデキストリンを存在させる、特許請求の範囲第18項、第19項、第20項、第21項、第22項、第23項、又は第24項記載の安定化用試薬。

(26) 溶液中の β -シクロデキストリンの濃度が0.01~1.5重量/容量%である特許請求の範囲第25項記載の安定化用試薬。

(27) 溶液中の γ -シクロデキストリンの濃度が0.01~10重量/容量%である特許請求の範囲第25項記載の安定化用試薬。

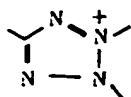
(28) 溶液中の β -シクロデキストリン及び γ -シクロデキストリンの濃度が、 β -シクロデキストリン0.01~1.5重量/容量%、 γ -シクロデキストリン0.01~10重量/容量%の範囲で任意の比率に混合した濃度である特許請求の範囲第25項記載の安定化用試薬。

(29) 溶液が、チオール化合物及び部分構造



を有するテトラゾリウム塩及び β -シクロデキストリン又は γ -シクロデキストリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液である、特許請求の範囲第25項、第26項、第27項又は第28項記載の安定化用試薬。

(30) テオール化合物及び部分構造



を有するテトラゾリウム塩及び β -シクロデキストリン又は γ -シクロデキストリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液が、基質に作用してスーパーオキシドイオンを生成させる酸化酵素を含有する特許請求の範囲第29項記載の安定化用試薬。

(31) グルコース、コレステロール、グリセロ

ル、グリセロール磷酸エステル、コリン、

アシル CoA、ビルビン酸、尿酸、キサンチン又は乳酸を基質とし、それらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール磷酸エステルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシル CoA オキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、キサンチンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼである特許請求の範囲第30項記載の安定化用試薬。

(32) テオール化合物が、還元型グルタチオン、チオグリコール酸、メルカプトエタノール、チオサリチル酸、システアミン、システイン、ジメルカプトコヘク酸である特許請求の範囲第30項又は第31項記載の安定化用試薬。

(33) 基質又は酸化酵素が被検試料中の基質又は酸化酵素である、特許請求の範囲第30項又は第31項記載の安定化用試薬。

(34) 基質又は酸化酵素が体液成分である、特

産の原因となる。

テトラゾリウム塩を用いる、被検試料中の体液成分の測定例を挙げると、スーパーオキシドイオン OT^- を定量的に生成する反応で生成したスーパーオキシドイオンにより定量的にテトラゾリウム塩類が還元されて生成するホルマジン化合物の呈色を定量する方法及び試薬がある。

このようなスーパーオキシドイオンの生成反応の例として、酸化酵素を基質に作用させ、スーパーオキシドイオンを生成させる酵素反応があるが、これは具体的実施に当り、好ましくは、テオール化合物、ペルオキシダーゼ、フェノール化合物の共存下で、酸化酵素を基質に作用させ、スーパーオキシドイオンを生成させる酵素反応により、目的成分を定量するものである。このスーパーオキシドイオンをテトラゾリウム塩と定量的に反応させて、テトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマジン化合物の呈色を定量的に測定する場合は、テオール化合物の存在により、それらテトラゾリウム塩が不安定となり、テオール化

許請求の範囲第33項記載の安定化用試薬。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、シクロデキストリンを有効成分とする、テトラゾリウム塩の安定化方法及び安定化用試薬に関するものである。

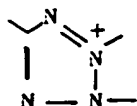
ニトロテトラゾリウムブルー（以下 NO_2^-TB と略記する。）等のテトラゾリウム塩類は一般に酸化還元電位が低く、還元されるとモノホルマジン化合物又はジホルマジン化合物のようなホルマジン化合物を生じ褐色～青色を呈するので、臨床化学、製薬化学、生化学、食品化学のような分野に於て、脱水素酵素の測定用試薬として或は還元型補酵素やスーパーオキシドイオンのような還元性物質の比色定量用試薬として広く用いられている。

しかしながら、テトラゾリウム塩類の水溶液は一般に安定ではあるが、テオール化合物等の還元性物質が存在すると次第に分解し、これに褐色を生じるが、試薬吸光度の経時的上昇をきたし、誤

合物及びテトラゾリウム塩を含有する溶液が着色して、目的成分の定量的測定を妨害する問題が生じる。

本発明者らは、上記問題点を解決すべく鋭意研究の結果、テトラゾリウム塩類を含有する溶液に、特定のシクロデkastリン、即ち、 β -シクロデkastリン又は α -シクロデkastリンを共存させることにより、テトラゾリウム塩が安定化されることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、 β -シクロデkastリン又は α -シクロデkastリンを有効成分として用いる部分構造



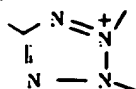
を有するテトラゾリウム塩の安定化方法及び試薬である。

α -シクロデkastリンにはそのような作用、効果はなく、 β -シクロデkastリン又は α -シクロデkastリンにのみ、そのような作用、効果

ン化合物が吸光度測定用の被染体であるセルなどに染着して誤差を生じるなどの問題点を有する。

この問題は、ゼラチンを有効成分として用いることにより解決された。即ち、ゼラチンは、テトラゾリウム塩から生成するホルマジン化合物の染着力を効果的に抑制し、同テトラゾリウム塩が還元されて生成する色素であるホルマジン化合物による被染体の染着を効果的に防止する効果を有するため、テトラゾリウム塩を含有する溶液にゼラチンを存在させると、そのような染着は効果的に防止される。

本発明は、 β -シクロデkastリン又は α -シクロデkastリンによって、部分構造



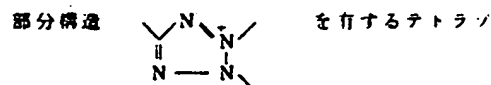
を有するテトラゾリウム塩を安定化させる以外、^{又は}そのようなテトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマジン化合物による染着をゼラチンを有効成分として用いて効果的に防止する以外は、

が認められる。

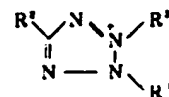
これは、一般的には、それら β -シクロデkastリン又は α -シクロデkastリンによるテトラゾリウム塩の包接作用によるものであると考えることができる。このようにして β -シクロデkastリン又は α -シクロデkastリンによって安定化されたテトラゾリウム塩であっても、スーパーオキシドイオンによるテトラゾリウム塩の還元反応は、充分速い反応速度で進行し、還元反応で生成したホルマジンの呈色を測定することにより、充分な感度でスーパーオキシドイオンを定量的に測定することができる。従って、 β -シクロデkastリン又は α -シクロデkastリンを添加しない場合と発色率の変化はなく、しかも、盲検値の上昇は抑制される。

又、本発明に關して用いるテトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマジン化合物は、ガラス材質、プラスチック材質などの被染体に強い染着性を有し、ホルマジン化合物による被染体の染着現象を惹起し、結果として、そのようなホルマジン

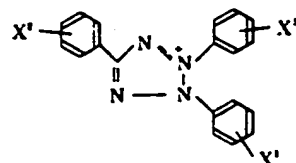
自体公知の方法及び試薬によっても容易に実施をすることができる。



リウム塩の典型のIは、有機残基 R^1 、 R^2 、及び R^3 をその置換基として有する、一般式(I)

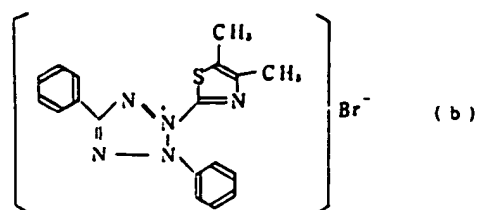


で示されるモノテトラゾリウム塩であり、そのようなモノホルマジン化合物(I)として代表的なものに一般式(II)

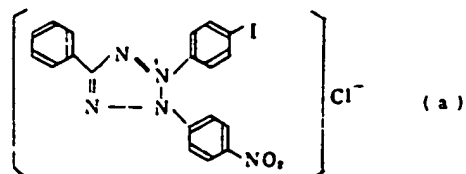


(但し X^1 及び X^2 は、 $-\text{NO}_2$ 又は $-\text{H}$ を表わし、 X^3 は、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{I}$ 又は $-\text{H}$ を表わす。)で示さ

れるモノテトラゾリウム塩や構造式(b)

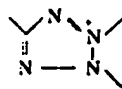


で示されるモノテトラゾリウム塩があり、一般式
(II)で示されるモノテトラゾリウム塩の一例と
して構造式(a)

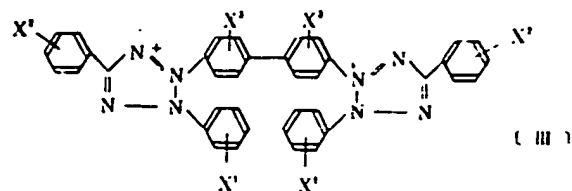


で示されるモノテトラゾリウム塩がある。

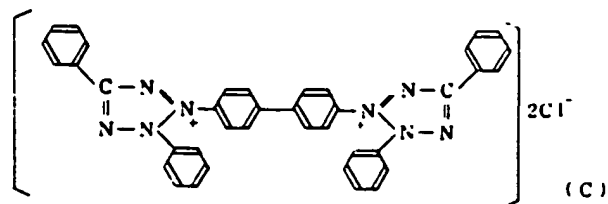
又、部分精選



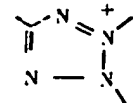
を有するテトラゾリウム塩の他の典型の1は一般式(III)



(但し X^1 及び X^2 は、 $-\text{NO}_2$ 又は $-\text{H}$ を表わし、 X^3 は、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{I}$ 又は $-\text{H}$ を表わす。) で示されるジテトラゾリウム塩であり、そのような一般式(Ⅲ)で示されるジテトラゾリウム塩の例として構造式(c)乃至(f)で示されるジテトラゾリウム塩がある。



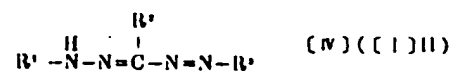
又、部分構造



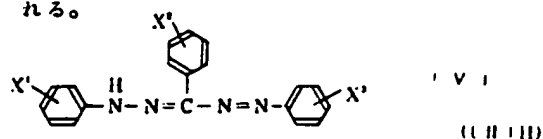
51757

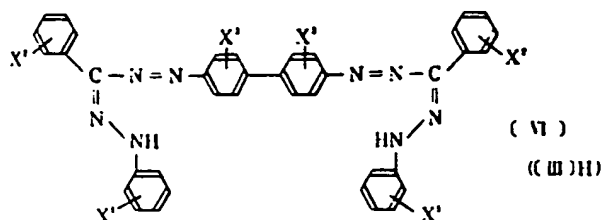
トラゾリウム塩が還元されて生成する部分構造

$$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{I} \\ | & & | \\ -\text{N} & - & \text{N} & = & \text{C} & - & \text{N} & = & \text{N} & - \end{array}$$
 を有するホルマジン化合物であつて一般式〔I〕で示されるモノテトラジウム塩から生成するモノホルマジン化合物は、一般式〔N〕〔(I)H〕で示される。



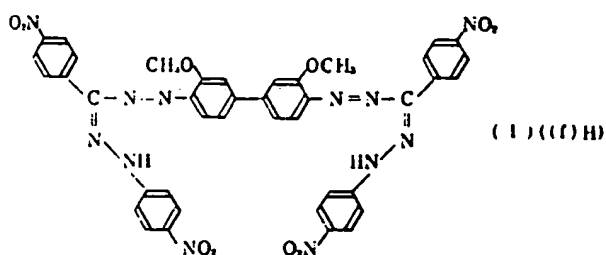
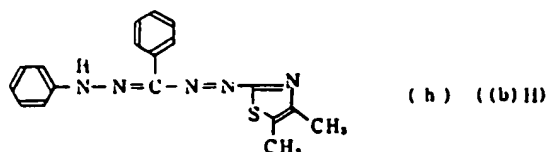
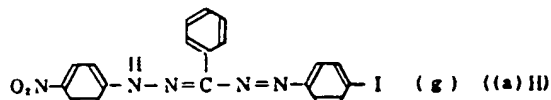
又、一般式〔Ⅱ〕で示されるモノテトラゾリウム塩又は一般式〔Ⅲ〕で示されるジテトラゾリウム塩から生成するホルマザンは、各々一般式〔Ⅴ〕（〔Ⅱ〕II）、一般式〔Ⅵ〕（〔Ⅲ〕II）で示される。



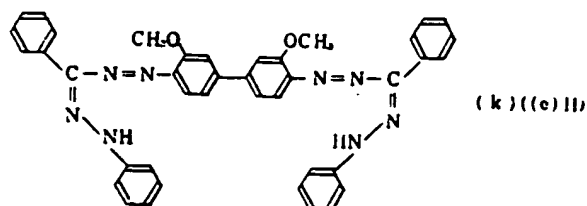
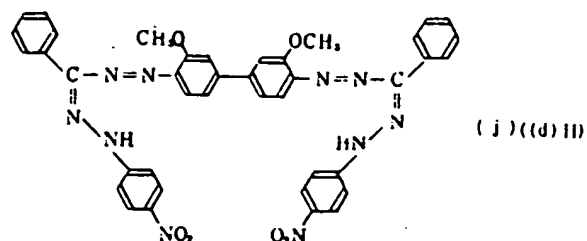
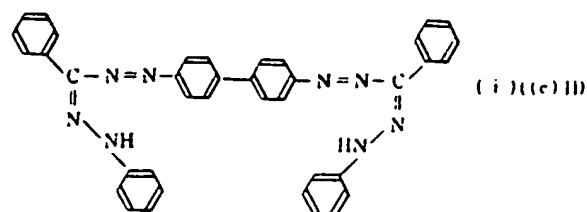


(但し、 X' 及び X'' は、 $-\text{NO}_2$ 又は $-\text{H}$ を表わし、 X' は、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{I}$ 又は $-\text{H}$ を表わす。)

又、構造式(a)乃至(f)で示されるテトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマジン化合物は、構造式(g) (a)H乃至(h) (f)Hで示される。



テトラゾリウム塩を安定化する β -シクロデキストリン又は α -シクロデキストリンの濃度について述べると、溶液中、 β -シクロデキストリンを用いる濃度の一例としては、溶液中、通常、0.01~1.5重量/容量%、 α -シクロデキストリンを用いる濃度の一例としては、同じく、溶液中、通常、0.01~1.0重量/容量%であり好ましい一例としては、通常、 β -シクロデキストリンは0.1~0.5重量/容量%、 α -シクロデキストリンは0.1~3重量/容量%が用いられる。又、 β -シクロデキストリンと α -シクロデキストリンを上記濃度で任意の比率で混合して用いてもよい。



本発明に於て特に効果的なゼラチンは、その平均分子量が20000~150000であるようなゼラチンであって、その分子量が例えば1000とか2000であるような水溶性ゼラチンについてはそのような効果は特に効果的ではないように見える。しかしながら、本発明に係るゼラチンは、その平均分子量が20000~150000であるようなゼラチンに限定されるものではなく、これら、その平均分子量が20000~150000であるようなゼラチンと同等な作用を有するものであれば、いずれのものでよい。なお、その由来は、動物の骨や皮などに由来するものが市販されているが、これらに限られるものではない。溶液中で効果的なゼラチン濃度は、通常、一例、0.1~0.7重量/容量%、好ましくは、一例、0.2~0.5重量/容量%である。

又、溶質に作用してスーパーオキサイドイオン O_2^- を生成させる酸化酵素による酵素反応の一例としては、溶質がグルコース、コレステロール、グリセロール、グリセロール磷酸エステル、コリン、アシルCoA、ビルビン酸、尿酸、キサンチン

又は乳酸であり、それらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール過酸化エステルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、キサンチンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼ等が挙げられる。このとき、共存させるチオール化合物の一例として、還元型グルタチオン、チオグリコール酸、メルカプトエタノール、チオサリチル酸、システアミン、システイン又はジメルカプトコハク酸が挙げられる。

本発明は、 β -シクロデキストリン又は γ -シクロデキストリンを有効成分として用いることにより、テトラゾリウム塩を安定化する方法及び試薬を提供するものであり、特に、基質に酸化酵素を作用させてスーパーオキシドイオン $O_2^{\cdot-}$ を生成させる反応の具体的実施に当り存在させるチオール化合物によるテトラゾリウム塩の不安定化の現象を効果的に防止する技術を提供するものであ

て、その結果、そのような反応を適用して被検試料中の目的成分(例えば、体液成分)を定量する測定の実験値の上昇を効果的に抑制するなどを含めて、一般に、テトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマジン化合物の呈色を測定する測定法及び試薬の臨床診断薬、製薬、化学、生化学、食品化学の分野に於る適用を極めて容易ならしめる点に於て所業に貢献する所、極めて大なるものがある。

以下に本発明に係る実施例を述べるがこれに限定されるものではない。

実施例1 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：各々、 NO_2^- -TDが20mg/ml、フェノールが0.01%、トリトンX-100が0.1%、パーオキシダーゼ(東洋紡績製)が300u/ml、コレステロールオキシダーゼ(天野製薬製)が15u/ml、グルタチオン(還元型)が20mg/ml、ゼラチンが0.5%、 β -シクロデキストリンが0.2%の濃度になるように、0.1Mトリス緩衝液(pH8.0)にこれらを溶解した液を発色試液とする。

血清遊離コレステロールの測定：血清50 μ lをとり、これに発色試液3mlを加えて、37℃恒温槽中10分間加温後水を対照として波長560nmにおける吸光度を測定する。別に、血清の代りにイオン交換水を用いて同様に操作して求めた吸光度を試薬盲検値とする。

血清の代りに、コレステロールの200mg/mlなるイソプロパノール溶液(標準液)を用いて同様に操作して標準の吸光度を求める。次式により血清中の遊離コレステロール濃度を算出する。

$$\frac{E_s - E_b}{E_{std} - E_b} \times 200 \text{ mg/ml}$$

E_s ：血清を用いたときの吸光度

E_b ：試薬盲検値

E_{std} ：標準液を用いたときの吸光度

比較例1 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例1の発色試液からゼラチンと β -シクロデキストリンを除いた発色試液を調製

する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1に同じ。

実施例1と比較例1の測定結果比較表

比較表 1

| 血清 試薬 | 実施例1 (mg/ml) | 比較例1 (mg/ml) |
|----------|-----------------|-----------------|
| 1 | 44.3 | 43.9 |
| 2 | 32.5 | 32.8 |
| 3 | 66.8 | 66.5 |
| 4 | 44.0 | 44.0 |
| 5 | 59.8 | 59.5 |
| 6 | 48.9 | 49.0 |
| 7 | 35.5 | 36.0 |
| 8 | 40.2 | 40.0 |
| 9 | 39.3 | 39.4 |
| 10 | 47.7 | 47.4 |
| 平均 | 45.90 | 45.85 |

比較表 2

試薬百検値の比較

| 項 目 \ 例 | 実施例 1 | 比較例 1 |
|----------------|-------|-------|
| 560nmの吸光度(水対照) | 0.076 | 0.183 |

比較表 3

コレステロール標準液呈色度の比較

| 項 目 \ 例 | 実施例 1 | 比較例 1 |
|--------------------|-------|-------|
| 560nmの吸光度(Fstd-Bs) | 1.267 | 1.271 |

比較表 4

室温保存に於ける発色試液の経時変化

| 保 存 時 間 \ 例 | 実施例 1 | 比 較 例 1 |
|-------------|-------|-----------|
| 0時間 | 澄 明 | 澄 明 |
| 18時間 | 澄 明 | 濁り及び少量の沈殿 |
| 48時間 | 澄 明 | 濁り及び大量の沈殿 |
| 72時間 | 澄 明 | 濁り及び大量の沈殿 |

実施例 1 と実施例 2 の測定結果比較表

比較表 1

試薬百検値の比較

| 項 目 \ 例 | 実施例 1 | 実施例 2 |
|----------------|-------|-------|
| 560nmの吸光度(水対照) | 0.076 | 0.081 |

比較表 2

室温保存に於ける発色試液の経時変化

| 保 存 時 間 \ 例 | 実施例 1 | 実施例 2 |
|-------------|-------|-------|
| 0時間 | 澄 明 | 澄 明 |
| 18時間 | 澄 明 | 澄 明 |
| 48時間 | 澄 明 | 澄 明 |
| 72時間 | 澄 明 | 澄 明 |

比較表 5

ガラスセルに対する染着性

| 項 目 \ 例 | 実施例 1 | 比 較 例 1 |
|---------|-------|-------------|
| 結 果 | 染着無し | セル全体が淡紫色に染着 |

コレステロール標準液の呈色液をガラスセルに入れ18時間室温に放置後液を捨てて水洗し乾燥して染着度を観測した。

比較表 1, 2, 3, 4, 5 から明らかなように、ゼラチンも、 β -シクロデキストリンも、酵素法によるコレステロールの定量には全く影響を与えず、これらは、試薬百検値の上昇を効果的に抑制し、かつ発色試液を安定化し及び、呈色液によるガラスセルの染着を効果的に防止する。

実施例 2 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例 1 の発色試液からゼラチンを除いた発色試液を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例 1 に同じ。

比較表 3

ガラスセルに対する染着性

| 項 目 \ 例 | 実施例 1 | 実 施 例 2 |
|---------|-------|-------------|
| 結 果 | 染着無し | セル全体が淡紫色に染着 |

比較表 1, 2, 3 から明らかなように、 β -シクロデキストリンは試薬百検値の上昇を効果的に抑制し、かつ発色試液の安定化の効果をも有するが、ガラスセルの染着を防止する効果は無い。

参考例 1. 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例 1 の発色試液から β -シクロデキストリンを除いた発色試液を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例 1 に同じ。

実施例 2 と参考例 1 の測定結果比較表

比較表 1

試薬百検値の比較

| 項 目 \ 例 | 実施例2 | 参考例1 |
|----------------|-------|-------|
| 560nmの吸光度(水対照) | 0.081 | 0.209 |

比較表 2

ガラスセルに対する染色性

| 項 目 \ 例 | 実施例2 | 参考例1 |
|---------|--------------|-------|
| 結 果 | セル全体が淡紫色に染色。 | 染色無し。 |

比較表1,2から明らかなようにセラチンには試薬1検値の上昇抑制効果は無いが、ガラスセルに対する染色防止効果がある。

実施例3 血清遊離コレステロールの測定

実施例1の発色試薬の調製法に従い、 β -ニトロデキストリンの代わりに γ -ニトロデキストリンを用い、これを0.3%の濃度に調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1と同じ。

比較例2 血清遊離コレステロールの測定

発色試薬 実施例3の発色試薬からセラチンと γ -ニトロデキストリンを除いた発色試薬を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1と同じ。

実施例3と比較例2の測定結果比較表

比較表 1

| 項 目 \ 例 | 実施例3 | 比較例2 |
|---------|------|------|
| 1 | 52.7 | 53.0 |
| 2 | 48.1 | 48.0 |
| 平 均 | 50.4 | 50.5 |

比較表 2

試薬1検値の比較

| 項 目 \ 例 | 実施例3 | 比較例2 |
|-----------|-------|-------|
| 560nmの吸光度 | 0.071 | 0.190 |

比較表 3

コレステロール標準液呈色度の比較

| 項 目 \ 例 | 実施例3 | 比較例2 |
|------------------------|-------|-------|
| (Hstd-Es) 560nmの吸光度 | 1.270 | 1.268 |

比較表 4

室温保存に於ける発色試薬の経時変化

| 保 存 時 間 \ 例 | 実施例3 | 比較例2 |
|-------------|------|-----------|
| 0時間 | 澄 明 | 澄 明 |
| 18時間 | 澄 明 | 濁り及び少量の沈殿 |
| 48時間 | 澄 明 | 濁り及び大量の沈殿 |
| 72時間 | 澄 明 | 濁り及び大量の沈殿 |

比較表 5

ガラスセルに対する染色性

| 項 目 \ 例 | 実施例3 | 比較例2 |
|---------|------|-------------|
| 結 果 | 染色無し | セル全体が淡紫色に染色 |

実験法は実施例1と同じ。

手続補正書

昭和59年 8月 27日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示

昭和58年特許願第95185号

2. 発明の名称

シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法

1. 補正をする者

事件との関係 発明者本人

郵便番号 541

住 所 大阪府大阪市東区通船町3丁目10番地
電話 TEL 03-270-0371名 称 和光純薬工業株式会社
代 表 者 二 力 二 生

2. 補正命令の日付

自 発

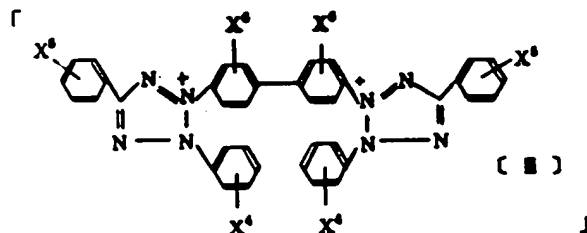


法である。」と補正する。

(6) 明細書21頁3行目に記載の「セラテンを有効成分として用いる」を「セラテンを用いる」と補正する。

(7) 明細書21頁18行目から同頁19行目にかけて記載の「セラテンを有効成分として用いて」を「セラテンを用いて」と補正する。

(8) 明細書24頁1行目から同頁5行目にかけて記載の一般式〔Ⅱ〕を以下のとおり補正する。



(9) 明細書24頁6行目から同頁7行目にかけて記載の「(但し X¹ 及び X² は、-NO₂ 又は -H を表わし、X³ は、-OCH₃、-I 又は -H を表わす。)」を「(但し X¹ 及び X² は、-NO₂ 又は -H を表わし、X³ は、-OCH₃、-I 又は -H を表わす。)」と補正する。

5. 補正により減少する発明の数 1

6. 補正の対象

明細書の発明の名称の欄、特許請求の範囲の欄及び発明の詳細な説明の欄。

7. 補正の内容

(1) 発明の名称の欄に記載の「シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法及び安定化用試薬」を「シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法」と補正する。

(2) 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。

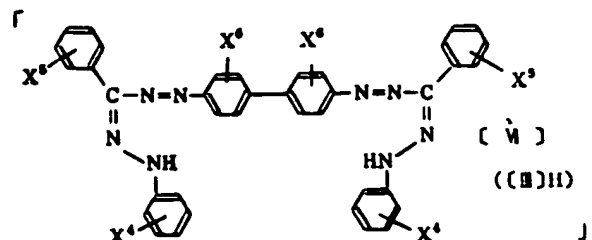
(3) 明細書19頁7行目に記載の「アーシクロデキストリンを共存」を「アーシクロデキストリンを夫々単独又は混合して共存」と補正する。

(4) 明細書19頁10行目から同頁11行目にかけて記載の「β-シクロデキストリン又はアーシクロデキストリン」を「β-シクロデキストリン又は/及びアーシクロデキストリン」と補正する。

(5) 明細書19頁15行目から同頁16行目にかけて記載の「テトラゾリウム塩の安定化方法及び試薬である。」を「テトラゾリウム塩の安定化方

と補正する。

(10) 明細書27頁1行目から同頁5行目にかけて記載の一般式〔Ⅳ〕((Ⅱ)H)を以下のとおり補正する。



(11) 明細書27頁6行目から同頁7行目にかけて記載の「(但し、X¹ 及び X² は、-NO₂ 又は -H を表わし、X³ は、-OCH₃、-I 又は -H を表わす。)」を「(但し、X¹ 及び X² は、-NO₂ 又は -H を表わし、X³ は、-OCH₃、-I 又は -H を表わす。)」と補正する。

(12) 明細書29頁15行目から同頁16行目にかけて記載の「好ましい一例としては、納溶、」を「好ましくは、」と補正する。

(13) 明細書30頁1行目に記載の「本発明に於て

特に効果的なゼラチンは、」を「ナトリウム塩から還元によって生成するホルマジン化合物の固定装置部材への染着を効果的に抑制するゼラチンは、」と補正する。

04明細書30頁5行目から同頁7行目にかけて記載の「しかしながら、本発明に係るゼラチンは、その平均分子量が」を「しかしながら、本発明で用いるゼラチンは、その平均分子量が」と補正する。

04明細書30頁14行目に記載の「通常、一例、0.1～0.7重量／容量多、」を「通常、0.1～0.7重量／容量多、」と補正する。

04明細書30頁14行目から同頁15行目にかけて記載の「好ましくは、一例、0.2～0.5重量／容量多」を「好ましくは、0.2～0.5重量／容量多」と補正する。

04明細書42頁9行目に記載の「実験法は実施例1に同じ。」の次に改行して以下の文章及び表を追加する。

「実施例4 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例1の発色試液の調製法に従い、

β-シクロデキストリンの代りに、β-シクロデキストリンとγ-シクロデキストリン1重量：1重量の混合物 0.2多を用いる。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1に同じ。

比較例3 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例4の発色試液からゼラチン、及びβ-シクロデキストリンとγ-シクロデキストリンの混合物を除いた発色試液を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1に同じ。

実施例4と比較例3の測定結果比較表

比較表1

血清試料測定結果

| 血清No. | 実施例4 ($\mu\text{g/dl}$) | 比較例3 ($\mu\text{g/dl}$) |
|-------|------------------------------|------------------------------|
| 1 | 60.5 | 61.1 |
| 2 | 48.9 | 48.3 |
| 3 | 55.2 | 54.7 |
| 4 | 35.5 | 36.1 |
| 5 | 42.6 | 42.3 |
| 平均 | 48.54 | 48.50 |

比較表2

試料回収率の比較

| | 実施例4 | 比較例3 |
|----------------|-------|-------|
| 560nmの吸光度(水対照) | 0.075 | 0.196 |

比較表3

コレステロール標準液吸光度の比較

| | 実施例4 | 比較例3 |
|-------------------------|-------|-------|
| 560nmの吸光度(Estd- E_0) | 1.283 | 1.277 |

比較表4

室温保存における発色試液の経時変化

| | 実施例4 | 比較例3 |
|------|------|-----------|
| 0時間 | 澄明 | 澄明 |
| 18時間 | 澄明 | 濁り及び少量の沈殿 |
| 48時間 | 澄明 | 濁り及び大量の沈殿 |
| 72時間 | 澄明 | 濁り及び大量の沈殿 |

比較表5

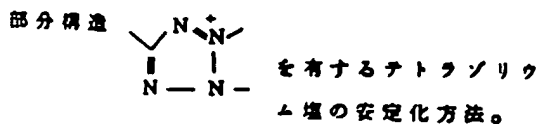
ガラスセルに対する染着性

| | 実施例4 | 比較例3 |
|----|------|-------------|
| 結果 | 染着無し | セル全体が淡紫色に染着 |

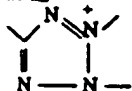
以上

2. 特許請求の範囲

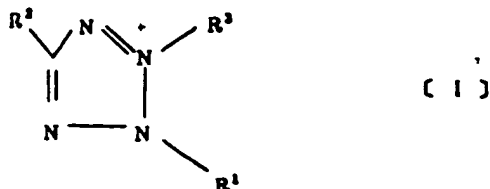
- (1) β -シクロデkastリン又は／及びア-シクロデkastリンを有効成分として用いる、



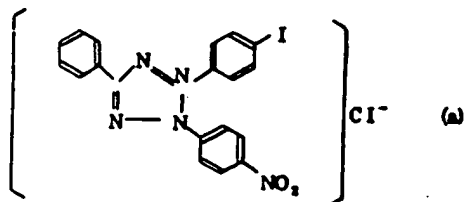
- (2) 部分構造



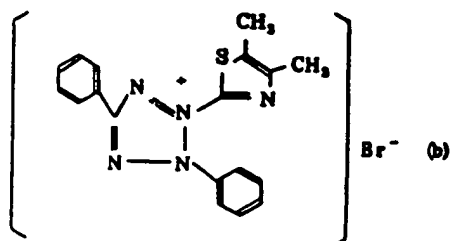
を有するテトラゾリウム塩が、一般式〔I〕で示されるモノテトラゾリウム塩である、特許請求の範囲第1項記載の安定化方法。

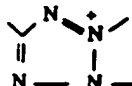


(但し、 R^1 、 R^2 及び R^3 は有機残基を表わす。)

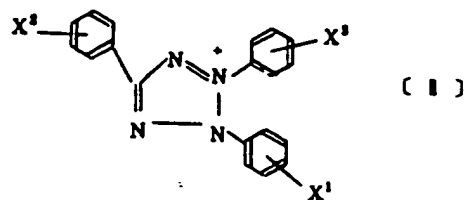


- (5) 一般式〔I〕で示されるモノテトラゾリウム塩が、構造式(a)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第2項記載の安定化方法。



- (6) 部分構造  を有するテ

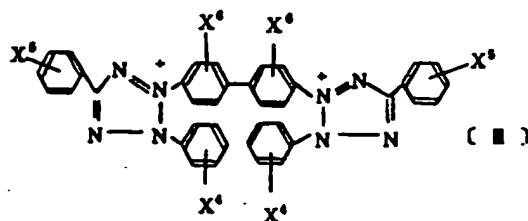
- (3) 一般式〔I〕で示されるモノテトラゾリウム塩が、一般式〔II〕で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第2項記載の安定化方法。



(但し、 X^1 及び X^2 は、 $-\text{NO}_2$ 又は $-\text{H}$ を表わし、 X^3 は、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{I}$ 又は $-\text{H}$ を表わす。)

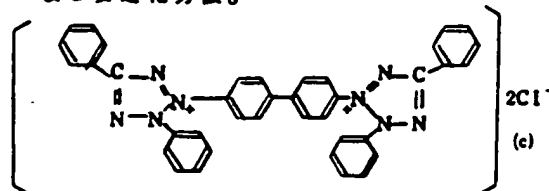
- (4) 一般式〔II〕で示されるモノテトラゾリウム塩が構造式(a)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第3項記載の安定化方法。

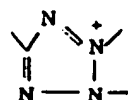
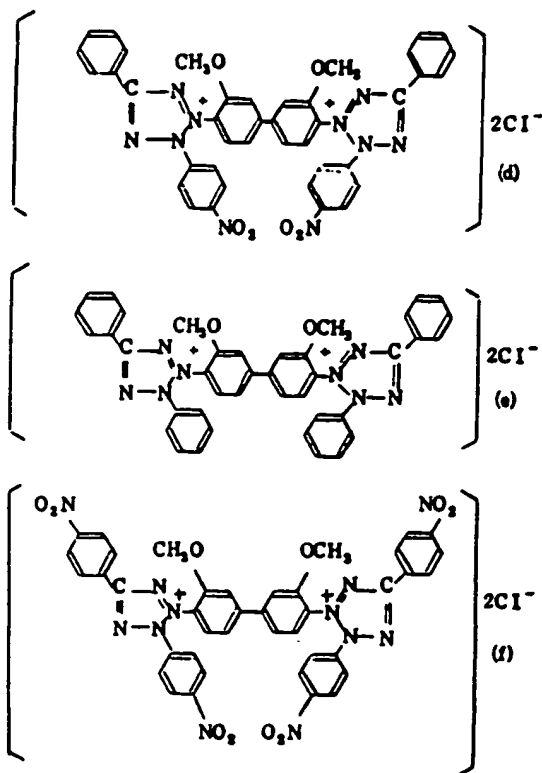
ラゾリウム塩が、一般式〔III〕で示されるジテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第1項記載の安定化方法。



(但し、 X^4 及び X^5 は、 $-\text{NO}_2$ 又は $-\text{H}$ を表わし、 X^6 は $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{I}$ 又は $-\text{H}$ を表わす。)

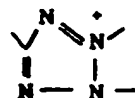
- (7) 一般式〔III〕で示されるジテトラゾリウム塩が、構造式(c)乃至(f)で示されるジテトラゾリウム塩の1である特許請求の範囲第6項記載の安定化方法。





を有するテトラゾリウム塩及びβ-シクロデkastリン又はγ-シクロデkastリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液である、特許請求の範囲第8項、第9項、第10項又は第11項記載の安定化方法。

03 テオール化合物及び部分構造



を有するテトラゾリウム塩及びβ-シクロデkastリン又はγ-シクロデkastリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液が、基質に作用してスーパーオキシドイオンを生成させる酸化酵素を含有する特許請求の範囲第12項記載の安定化方法。

04 グルコース、コレステロール、グリセロール、グリセロール脂肪酸エステル、コリン、ア

(8) 溶液中にβ-シクロデkastリン又はγ-シクロデkastリンを存在させる、特許請求の範囲第1項、第2項、第3項、第4項、第5項、第6項、又は第7項記載の安定化方法。

(9) 溶液中のβ-シクロデkastリンの濃度が0.01~1.5重量/容量多である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

00 溶液中のγ-シクロデkastリンの濃度が0.01~10重量/容量多である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

01 溶液中のβ-シクロデkastリン及びγ-シクロデkastリンの濃度が、β-シクロデkastリン0.01~1.5重量/容量多、γ-シクロデkastリン0.01~10重量/容量多の範囲で任意の比率に混合した濃度である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

02 溶液がテオール化合物及び部分構造

シルCoA、ビルビン酸、尿酸、キサンチン又は乳酸を基質とし、それらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール脂肪酸エステルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、キサンチンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼである、特許請求の範囲第13項記載の安定化方法。

03 テオール化合物が、還元型グルタチオン、チオグリコール酸、メルカプトエタノール、チオサリチル酸、システアミン、システイン、ジメルカプトコハク酸である特許請求の範囲第12項又は第13項記載の安定化方法。

04 基質又は酸化酵素が被検試料中の基質又は酸化酵素である、特許請求の範囲第13項又は第14項記載の安定化方法。

05 基質又は酸化酵素が体液成分である、特許請求の範囲第16項記載の安定化方法。

以上

手続補正書

特開59-219270(16)

昭和59年 8月 29日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和58年特許願第95185号

2. 発明の名称

シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 541

住所 大阪府大阪市東区通船町3丁目10番地
電話 TEL 03-270-0571

名称 和光純工業株式会社

代表者 一 力 二 生

4. 補正命令の日付

自 発

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄。

6. 補正の内容

(1)明細書31頁11行目に記載の「システイン又はジメルカプトコハク酸が」を「システイン、ジメルカプトコハク酸、又はコエンザイムA(CoA)が」と補正する。

以上